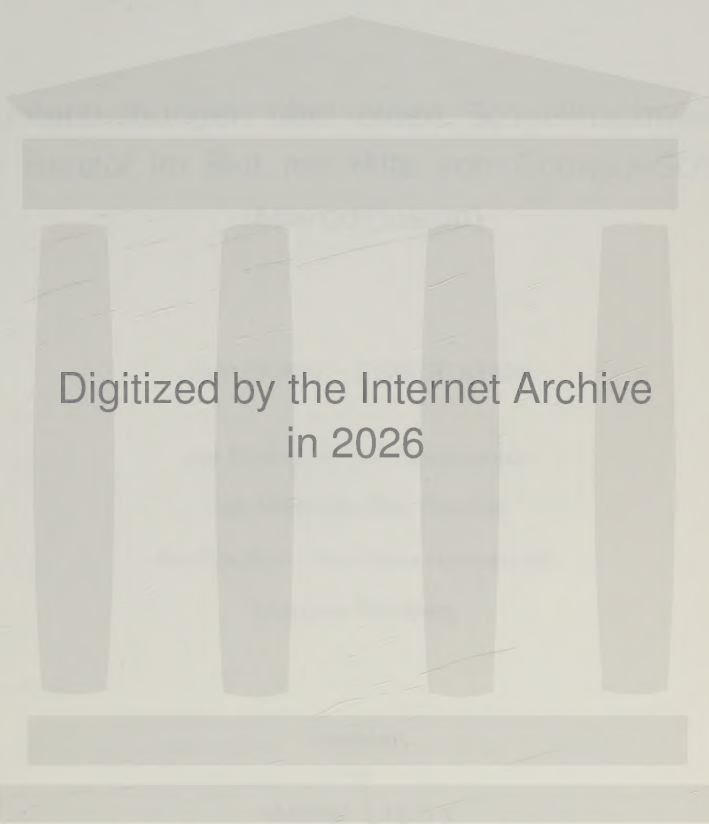


Untersuchungen über einen Schnellnachweis
von Benzol im Blut mit Hilfe von Conway-Schalen
(Mikrodiffusion)

von
Walter Lipps
aus
Schwabach

1981



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546216_0071

Aus dem Institut für Rechtsmedizin

der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. Dr. H. B. Wuermeling

Untersuchungen über einen Schnellnachweis
von Benzol im Blut mit Hilfe von Conway-Schalen
(Mikrodiffusion)

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung der Doktorwürde

der Medizinischen Fakultät

der Friedrich - Alexander - Universität

Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Walter Lipps

aus

Schwabach

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. V. Becker
Referent: Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v.Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 16.11.1981

Meinen lieben Eltern
und meiner lieben Frau
in Dankbarkeit
gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Seite

1.	<u>Einleitung</u>	1
2.	<u>Aufnahmewege für Benzol in den Organismus</u>	2
3.	<u>Kinetik</u>	3
4.	<u>Stoffwechsel</u>	7
5.	<u>Die chronische Benzolintoxikation</u>	8
6.	<u>Die akute Benzolintoxikation</u>	10
7.	<u>Nachweismethoden für eine stattgehabte Benzolexposition</u>	12
8.	<u>Problemstellung</u>	16
9.	<u>Beschreibung der Mikrodiffusionsmethode</u>	17
9.1	Technik dieser Methode	17
9.2	Reaktionsmechanismus der Mikrodiffusionsmethode	20
10.	<u>Prüfung der Mikrodiffusionsmethode und Kritik mit Entwicklung einer eigenen Variante</u>	23
10.1	Originalarbeitsvorschrift für die Mikrodiffusionsmethode	23
10.2	Prüfung und Kritik der Originalarbeitsvorschrift	24
10.3	Eigene Arbeitsvorschrift für die Mikrodiffusionsmethode	30
10.4	Aufstellung einer Eichkurve	31
10.5	Bestimmung der Wiederfindungsrate	35
10.6	Prüfung der Spezifität	40
10.7	Nachweisgrenze des Verfahrens	42
11.	<u>Diskussion</u>	42
13.	<u>Literaturverzeichnis</u>	44

1. E i n l e i t u n g

Die wasserhelle, aromatisch riechende Flüssigkeit Benzol wurde 1825 von Faraday erstmals aus komprimiertem Ölgas hergestellt. Liebig gab ihr 1834 den Namen und 1875 stellte Kekule die bekannte Sechsring-Formel auf.

Bis zum Jahre 1960 waren bereits rund 100 000 Benzolderivate bekannt, heute dürften es noch wesentlich mehr sein. Etwa die Hälfte der westdeutschen Benzolproduktion wird als Zusatz zu Motorkraftstoffen verwendet, weiterhin dient Benzol als Ausgangsstoff für die Darstellung vieler seiner Derivate sowie als Lösungsmittel für die verschiedensten Substanzen.

Von besonderer Bedeutung ist, daß Benzol eine sehr flüchtige Substanz ist und eine sehr gute Löslichkeit in Lipiden besitzt. Benzol reichert sich deshalb besonders in Geweben mit hohem Fettgehalt an, z.B. im Gehirn und im Knochenmark. Es besitzt zentraldepressorische Wirkungen und Reizwirkungen auf Haut und Schleimhäute. Darüber hinaus schädigt es die blutbildenden Systeme, vor allem bei langfristiger Einwirkung. Schädigungen der parenchymatösen Organe, wie Leber und Niere, treten nur nach Aufnahme sehr hoher Dosen auf und stehen weder beim akuten noch beim chronischen Vergiftungsfall im Vordergrund.

2. Aufnahmewege für Benzol in den Organismus

Die Aufnahme von Benzol in den Körper kann perkutan, peroral und inhalatorisch erfolgen, wobei die letzte Form die größte Rolle spielt. Benzol wird als Dampf über die Lungen leicht resorbiert. Bei einer akuten Vergiftung werden 30 - 70 % des Benzols unverändert und zu einem kleinen Anteil als CO_2 in den ersten zwei Tagen ausgeschieden. Der retinierte Anteil beträgt nach Einstellung des Blut/Luft-Gleichgewichts 40 - 50 % (Steinborn, 1965).

Über die perkutane Aufnahme von Benzol in den Körper als Krankheitsursache wird noch diskutiert. In der Literatur findet sich nur eine kurze Notiz über gezielte Messungen, nach der $0,4 \text{ mg/cm}^2$ Std. aufgenommen werden sollen (Dutkiewicz, 1968).

Die perorale Aufnahme von Benzol wird wohl äußerst selten erfolgen. Drei Fälle mit aplastischer Anämie sowie ein Fall einer thrombopenischen Purpura traten nach dem unabsichtlichen Trinken eines Benzin-Benzolgemisches auf. Einem anderen Patienten war beim Durchpusten einer Benzinleitung Benzin in den Mund geflossen, das eine Aspirationspneumonie und eine langanhaltende Neutropenie verursachte (Steinborn, 1965). Die Toxizität bei oraler oder parenteraler Verabfolgung von Benzol wurde nur in wenigen Untersuchungen an Tieren geprüft. So ist zum Beispiel das Trinken von 15 ml Benzol für ein Kaninchen nach etwa 7 1/2 Stunden tödlich (Schuckmann, 1972). Die aktuelle Benzolkonzentration im Blut wurde jedoch bei diesen Versuchen nicht untersucht.

3. Kinetik

Infolge der hohen Lipoidlöslichkeit wird Benzol, wie schon angesprochen, vor allem im Fett und Nervengewebe angereichert. 30 - 50 % des resorbierten Benzols werden unverändert über die Lungen ausgeschieden und zwar in einer typischen Drei-Phasen-Charakteristik (Sherwood, 1972). Im Harn erscheinen nur unbedeutende Spuren unveränderten Benzols.

Nähere Untersuchungen über die Kinetik von Benzol wurden an der Shinsu Universität in Japan durchgeführt (Sato et al., 1974). Drei Versuchspersonen inhalierten dort über einen Zeitraum von 2 Stunden Raumluft mit einer Konzentration von 25 ppm Benzol. Anschließend wurde den Probanden aus beiden Cubitalvenen Blut entnommen und die Benzolkonzentration im Blut bestimmt; weiterhin wurde die Benzolkonzentration in der Ausatemungsluft bestimmt. Die Benzolkonzentration im Blut sowie in der Ausatemungsluft wurde in bestimmten Zeitabständen über 5 Stunden bestimmt. Siehe dazu Abb. 1 und 1a.

Bei diesen Versuchen stellte sich heraus, daß die Benzolkonzentration im Blut in ähnlicher Weise abnimmt wie die Benzolkonzentration in der Ausatemungsluft, was sich aus den beiden abgebildeten Kurven leicht ablesen läßt. Weiterhin zeigte sich, daß die drei Versuchspersonen durchaus unterschiedliche Konzentrationen an Benzol im Blut und in der Ausatemungsluft aufwiesen. Die Benzolkonzentration im Blut nach Exposition ist abhängig von Faktoren wie Herzzeitvolumen, alveolärer Ventilation, vom Diffusions/Perfusionsverhältnis in der Lunge sowie von der Stoffwechselleistung des Organismus (Sato et al., 1974). Siehe dazu Abbildung 2.

Benzol im Blut

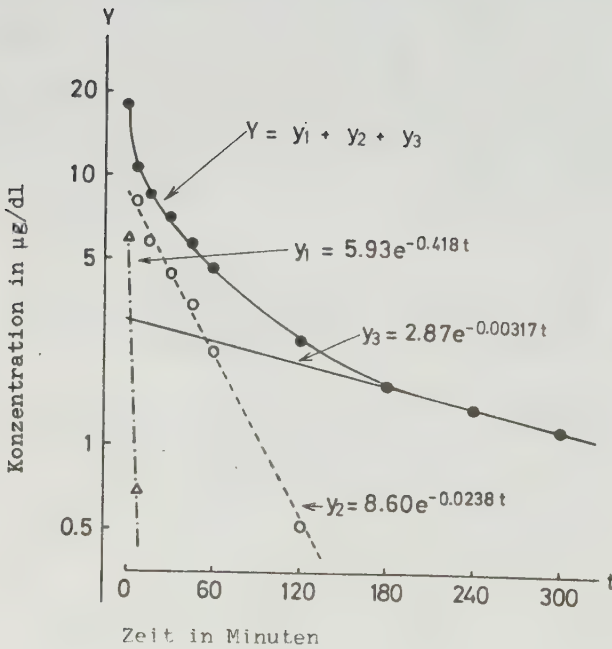


Abb. 1

Abklingkurven für Benzol im Blut bei 3 verschiedenen Personen (Sato et al., 1974)

Benzol in der Ausatemluft

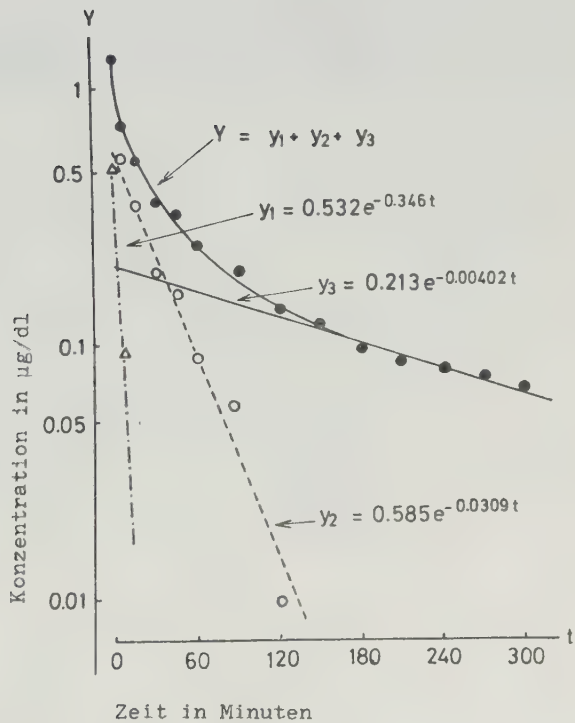


Abb. 1a:

Abklingkurven für Benzol in der Ausatemluft
bei 3 verschiedenen Personen (Sato et al., 1974)

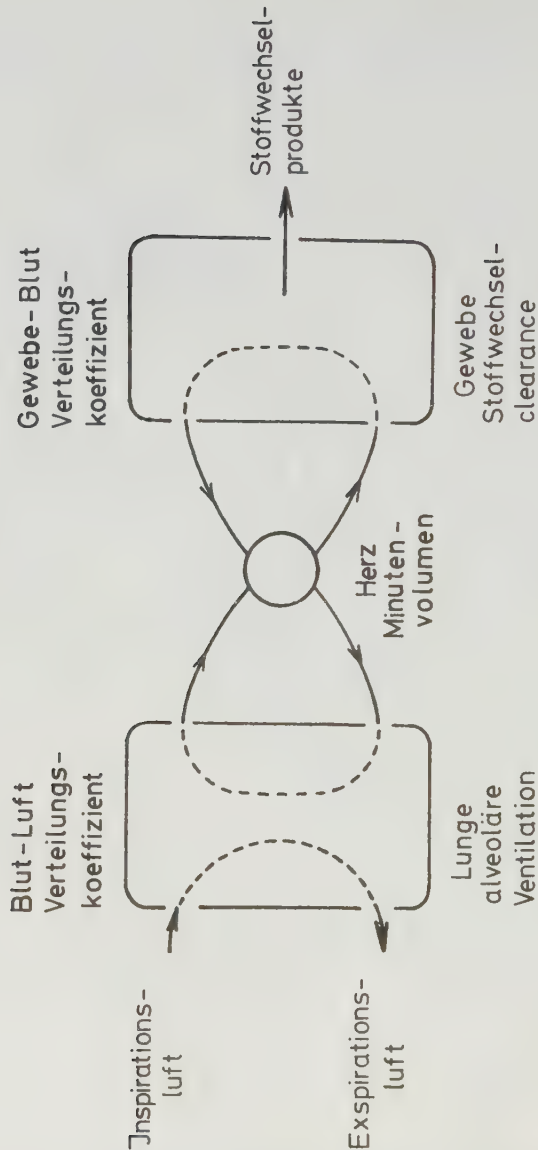


Abb. 2

Faktoren, welche die Absorption, Verteilung und Elimination organischer Lösungsmitteldämpfe im menschlichen Körper beeinflussen (Sato et al., 1972)

Die Untersuchungen an der Universität Shinsu bestätigen auch die Ergebnisse von Sherwood über die Elimination von Benzol aus dem Blut. Auch bei den Untersuchungen an der japanischen Universität fand sich eine Drei-Phasen-Charakteristik in der Elimination von Benzol, und zwar eine schnelle, eine langsame und eine sehr langsame Phase der Elimination.

4. Stoffwechsel

Benzol, welches nicht über die Lungen abgeatmet oder unverändert im Urin ausgeschieden wird, erfährt im Organismus eine metabolische Umwandlung in leichter wasserlösliche und damit rascher ausscheidbare Derivate. Der Intermediärstoffwechsel des Benzols wurde vor allem von Porteous und Williams untersucht. Die Autoren verfolgten den Stoffwechsel von radioaktiv markiertem Benzol im tierischen Organismus und stellten fest, daß etwa zwei Drittel der aufgenommenen Substanz innerhalb von zwei Tagen über die Lungen ausgeschieden werden. Das im Körper verbliebene Benzol wird dann zu Phenol, Hydrochinon und Brenzkatechin oxydiert (Porteous und Williams, 1949). Diese Substanzen werden wiederum, an Schwefel- und Glukuronsäure gepaart, im Harn ausgeschieden.

Der Hauptweg ist die Oxidation zu Phenol, welche durch die mischfunktionellen Oxidasen der Leberzelle erfolgt. Erste Reaktionsstufe ist das hochreaktive Benzolepoxid, welches wahrscheinlich für die knochenmarkstoxische Wirkung verant-

wortlich ist, da weder Phenol noch die Dihydroxybenzole knochenmarksschädigende Wirkung zeigen (Henschler, 1979). Die Epoxidbrücke wird weiterhin nichtenzymatisch oder enzymatisch unter Anlage von Glutathion aufgespalten, welches in einem weiteren Schritt in harnpflichtige Phenylmerkaptursäure übergeführt wird. Neben diesem Umsatz kann, wie schon gesagt, weitere Oxidation zu Brenzkatechin, Chinon und Hydrochinon erfolgen (Laham, 1970; Bakke und Scheline, 1970). In erster Linie findet eine Kopplung von Phenol an Glukuronsäure und Schwefelsäure statt; die Bildung von Phenylmerkaptursäure ist quantitativ viel geringer (Porteous und Williams, 1949).

5. Die chronische Benzolintoxikation

In der Literatur wird eine Vielzahl von Schädigungen des hämatopoetischen Systems durch kleine und kleinste Benzolmengen beschrieben. Es werden verschiedenste Veränderungen sowohl des erythropoetischen als auch des leukopoetischen und des thrombopoetischen Systems beobachtet. Es lassen sich jedoch keine quantitativen Zusammenhänge zwischen Konzentrationshöhe bzw. Einwirkungsdauer und dem Auftreten von z.B. Leukosen ableiten (Hernberg et al., 1966). In der Literatur finden sich Fälle von akuter myeloischer Leukämie (Hartwich et al., 1969), von akuter lymphatischer Leukose mit vorheriger Lymphozytose (Barrelet, 1961), von Panmyelopathien (Dubois, 1961) sowie von Thrombozytopenien (Lob, 1977) bei beruflicher Exposition. Zahlreiche weitere Fälle mit leichten bis schweren Veränderungen des Blutbildes sind beschrieben, die alle hier aufzuführen jedoch zu weit führen würde. Häufig ist bei den Erythrozyten erste Reaktion eine Zunahme (initialer Reizzustand), der eine Ver-

minderung folgt. Gleiches wird auch bei Leukozyten beobachtet (Henschler, 1979).

Man nimmt auch an, daß benzolbedingte Blutschäden auf dem Boden einer Kombination mit anderen chemischen oder auch physikalischen Einwirkungen entstehen, da bei der gleichen Exposition von 154 Arbeitern in einem pharmazeutischen Betrieb nur 4 erkrankten. Diese 4 hatten während der Expositionszeit eine zusätzliche Belastung: In einem Fall war es eine chronische Infektionskrankheit, die drei anderen gebrauchten sehr häufig Sulfonamide und Analgetica (Henschler, 1979). Auch genetische Faktoren sollen bei der Auslösung einer Benzolschädigung des menschlichen Organismus eine Rolle spielen (Zeyer, 1961).

Benzol bzw. Benzolmetabolite können auch chromosomale Veränderungen hervorrufen. Die Bedeutung für ein genetisches und ein Krebsrisiko dieser primär bei gewerblich Exponierten in somatischen Zellen gefundenen chromosomalen Veränderungen wird zur Zeit noch diskutiert. Für strukturelle und numerische Chromosomenaberrationen, die durch Benzol verursacht wurden, gibt es in der Literatur zahlreiche Beispiele (Tough et al., 1970; Forni und Moreo, 1969; Hartwich et al., 1969).

Um eine stattgehabte Benzolexposition nachzuweisen, wurde bei den meisten Fällen, die sich in der Literatur finden, die Phenolbestimmung im Harn durchgeführt. Nur selten finden sich Angaben über Benzolkonzentrationen im Blut bei chronisch Exponierten, so bei einem Laboranten in einem Prüflabor des Straßenbauwesens; es wurde ein Spitzenwert von 80 µg/100 ml Blut festgestellt (Hagemann und Angerer, 1977).

In einem anderen Fall von chronischer Exposition fand sich ein Wert von 20 µg/100 ml Blut (Sato et al., 1975).

Die Diskussion der Frage, ob für Benzol in der Luft am Arbeitsplatz ein unbedenklicher Grenzwert abgeleitet werden kann, ist noch im Gange (Truhaut, 1968). Wegen der nachgewiesenen carcinogen Wirkung und dem Mangel an quantitativen Meßdaten in geringen Konzentrationsbereichen kann der früher gültige MAK-Wert für Benzol von 25 ppm nicht mehr aufrechterhalten werden und es kann auch kein neuer MAK-Wert genannt werden. Wegen der Gefahr der Hautresorption bei beruflichem Umgang erhält der Stoff in der MAK-Wert-Liste die Zusatzbezeichnung "H" (Henschler, 1979).

6. Die akute Benzolintoxikation

Akute Vergiftungen mit Benzol treten nur bei relativ hohen Luftkonzentrationen ein. 20 000 ppm (1 ppm = 3,247 mg/m³) sollen schon nach 5 - 10 Minuten tödlich sein (Henschler, 1979). 700 ppm erzeugen nach 30 - 60 Minuten Bewußtlosigkeit (Drozd und Bockowski, 1967). Die leichte Form der Benzolvergiftung äußert sich in Schwindel, Benommenheit, Kopfschmerzen und Brechreiz. Gleichzeitig besteht ein Trunkenheitsgefühl mit euphorischen, rauschähnlichen Bildern, wodurch die Einsicht in die Gefahr häufig herabgesetzt wird. Die euphorische Komponente wird als Ursache der bei manchen Personen beobachteten regelrechten Benzolsucht angesehen (Winek und Collom, 1967). Hohe Benzolkonzentrationen erzeugen Schwindel, Schweißausbrüche, Herzflattern, absolute Arrhythmie, Erbrechen, Krämpfe und Lähmungen. Der Tod tritt durch Kreislaufversagen ein. In diesem Stadium der Vergiftung ist

das Blut bei mikroskopischer Prüfung unverändert (Zeyer, 1961) trotz eines Benzolgehaltes von 1 - 20 mg/l (Winek und Tauber, 1971).

In der Literatur werden mehrere Fälle von akuten Benzolintoxikationen beschrieben.

So beschreibt Tauber (1970) den Unglücksfall eines 45jährigen Mannes, der nach einer leichten körperlichen Anstrengung und dem anschließenden Inhalieren eines benzolhaltigen Dampfgemisches an seinem Arbeitsplatz verstarb. Bei dem Mann wurde eine Benzolkonzentration von 3,8 mg/l Blut gefunden.

Die "American Academy of Forensic Sciences" berichtet über den Todesfall eines Erwachsenen, in dessen Blut eine Benzolkonzentration von 9,4 mg/l gefunden wurde (Tauber, 1970).

Ein anderer Fall wird in einem Artikel aus "The Lancet" beschrieben: Es ist der Fall eines 16jährigen Jungen, der sich durch das Schnüffeln von benzolhaltigem Dampf in einen Rauschzustand versetzen wollte und dabei zu Tode kam. Seine Benzolkonzentration im Blut betrug 940 mg/l (Winek et al., 1967).

In der Literatur finden sich noch mehr Quellen über Unglücksfälle, die sich beim "Schnüffeln" von benzolhaltigem Dampf ereigneten. Interessant für unsere Untersuchungen mit der Mikrodiffusionsmethode sind auch hier wieder die Benzolkonzentrationen im Blut, die bei diesen Fällen gefunden wurden. So fand man bei einem 18jährigen Jungen eine Benzolkonzentration im Blut von 20 mg/l, in einem anderen Fall

eine Konzentration von 0,94 mg/l Blut und in einem dritten Fall eines 19jährigen Jungen fanden sich 38 mg/l Blut (Winek et al., 1971). Die Spannweite der in der Literatur gefundenen Werte für Benzol im Blut bei akuten Intoxikationen mit tödlichem Ausgang ist relativ groß; sie reicht von Konzentrationswerten von 0,94 mg/l Blut bis zu Werten von 940 mg/l Blut. Es läßt sich also nicht unbedingt eine Benzolkonzentration im Blut festlegen, die für einen Menschen sicher tödlich ist. Die relativ großen Unterschiede zwischen den einzelnen Konzentrationswerten lassen sich auch damit erklären, daß die Opfer der Vergiftungsfälle bis zu ihrem Tod eine unterschiedlich lange Zeit die Möglichkeit hatten, den inhaliierten Benzoldampf wieder abzuatmen. Weiterhin wurde die Bestimmung der Benzolkonzentration im Blut bei den verschiedenen Vergiftungsfällen nicht immer zum gleichen Zeitpunkt nach Beendigung der Exposition durchgeführt. Da die Benzolkonzentration im Blut vom Zeitpunkt der Exposition bis zum Zeitpunkt der Analyse sehr rasch exponentiell abnimmt (Szadkowski et al., 1970), lassen sich die in der Literatur gefundenen Benzolkonzentrationswerte im Blut nur sehr schwer miteinander vergleichen. Siehe dazu Abbildung 3.

7. Nachweismethoden für eine stattgehabte Benzol- exposition

Zum Nachweis einer stattgehabten Exposition gegenüber Benzol eignen sich mehrere Methoden. Als Maß für die Exposition gilt sowohl die Menge der gekoppelten Schwefelsäure als auch die Menge von ausgeschiedenem Phenol, wobei sich

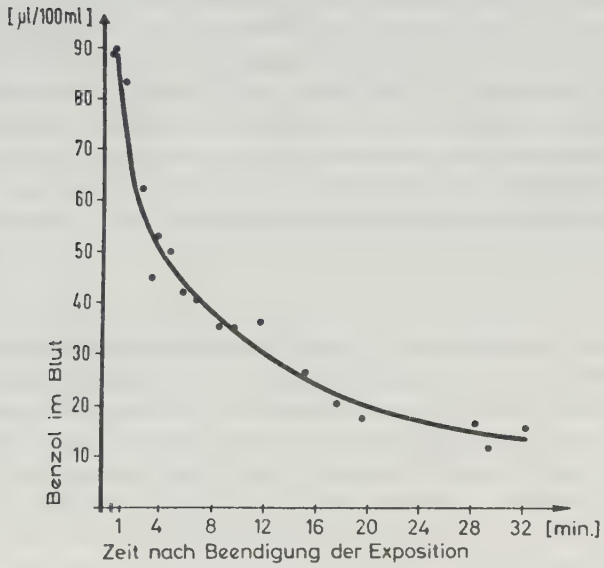


Abb. 3:

Abklingkurve für Benzol im Blut nach entsprechender Lösemittelexposition eines Kaninchens (Szadkowski et al., 1970)

mit steigender Benzolexposition das Verhältnis von anorganischem Sulfat zu Gesamtsulfat im Harn vermindert. Der quantitative Nachweis einer stattgehabten Benzolexposition ist mit folgenden Methoden möglich:

1. Messung des Benzolgehaltes der Atemluft
2. Messung des Phenolgehaltes im Harn nach abgeschlossener Aufnahme
3. Messung des anorganischen Sulfats als Teil des Gesamtsulfats im Harn.

Die Überprüfung der Benzolkonzentration in der Atemluft über eine gewisse Zeit nach stattgehabter Exposition eignet sich zur Beurteilung der aufgenommenen Benzolmenge, da sie von der Zeitdauer der Exponierung und damit vom Grad der Aufsättigung der Fettgewebe des Organismus abhängt. Die Benzolkonzentration in der Atemluft unterliegt aber auch großen Schwankungen (Henschler, 1979).

Auch die Ergebnisse von Phenolanalysen im Harn unterliegen großen Schwankungen. Die alleinige Phenolbestimmung im Harn liefert keine verlässliche Anzeige der stattgehabten Benzolaufnahme. Dies gilt besonders für geringgradige Expositionen im Bereich früherer MAK-Werte und darunter. Der Grund hierfür dürfte in erster Linie, neben analytischen Schwierigkeiten, in einer Überlagerung durch "Normalphenol" aus der Nahrung liegen. Je höher die Benzolexposition und die ausgeschiedene Phenolmenge, desto aussagekräftiger ist der Harnbefund (Henschler, 1979).

Gleichzeitige Einnahme von Alkohol vermehrt die Abatmung von Benzol und beschleunigt die Ausscheidung von Phenol (Sherwood, 1972).

Der prozentuale Anteil des anorganischen Sulfates am Gesamtsulfat, der normalerweise zwischen 90 und 100 % schwankt, ändert sich erst nach längerer Benzolexposition. Etwa bei 70 % anorganischem Sulfat vom Gesamtsulfat treten die ersten Veränderungen im Blutbild auf.

Als quantitative Methoden für einen Nachweis von Benzol im Blut lassen sich vor allem gaschromatographische Methoden verwenden. Die Brauchbarkeit eines solchen Verfahrens für arbeitsmedizinisch-toxikologische Überwachungsuntersuchungen lösemittel-exponierter Werktätiger wurde an der Universität Erlangen-Nürnberg untersucht (Szadkowski et al., 1971).

Es handelt sich hierbei um ein quantitatives Verfahren bei einer reinen Arbeitszeit von 2 Minuten und einer Gesamtanalysedauer von 10 Minuten bei einer Retentionszeit von 3,8 Minuten. Man erhielt linear verlaufende Eichkurven und als Nachweisgrenze ergab sich eine Benzolkonzentration von 2 µl/100 ml Blut.

In neueren Untersuchungen wurde Benzol durch eine gaschromatographische Analyse des Dampftraums (head space) über den Blutproben mit einem Flammenionisationsdetektor bestimmt (Henschler, 1978). Die Nachweisgrenze bei diesem Verfahren liegt um den Faktor 300 niedriger als bei dem 1971 beschriebenen Verfahren; sie liegt bei etwa 20 µg/l Blut.

8. Problemstellung

Die oben beschriebenen Nachweismethoden, mit Ausnahme des semiquantitativen Nachweises von Benzol in der Atemluft, erfordern einen ziemlich hohen Aufwand an Geräten und sind überdies sehr kostspielig. Mit Ausnahme des gaschromatographischen Verfahrens eignet sich keine Methode zum direkten quantitativen Nachweis von Benzol im Blut. Eine exakte quantitative Analyse von Benzol im biologischen Material wäre jedoch anzustreben.

Der Nachweis von Benzol im Blut mit Hilfe der Mikrodiffusionsmethode wäre ein billiges und schnelles Verfahren, welches durchaus z.B. in der ärztlichen Allgemeinpraxis zur Verwendung kommen könnte. Mit Hilfe weniger Reagenzien und einer Conway-Schale könnte man schon am Ort der Exposition feststellen, ob etwaige Vergiftungserscheinungen auf meßbare Benzolkonzentrationen im Blut zurückzuführen sind.

Die Fragen, die sich dem Untersucher stellten, waren vor allem, ob das Verfahren für Benzol spezifisch ist, ob es quantitative Bestimmungen zuläßt und inwieweit die Nachweisgrenze des Verfahrens für schon toxische Benzolkonzentrationen im Blut ausreicht.

9. Beschreibung der Mikrodiffusionsmethode

9.1 Technik dieser Methode

Der Mikrodiffusionsmethode liegt folgendes Prinzip zugrunde: Hält man die Lösung einer flüchtigen Substanz und ein reines Lösungsmittel in getrennten Räumen innerhalb eines dritten luftabgeschlossenen Raumes, so wird die flüchtige Substanz die Tendenz zeigen, aus der Luft in das reine Lösungsmittel zu diffundieren. Dies führt dazu, daß immer mehr flüchtige Substanz aus der Lösung in die umgebende Luft gelangt und von dort in das anfangs reine Lösungsmittel diffundiert. Nach einer bestimmten Zeit wird sich ein Gleichgewicht einstellen. Verwendet man nun anstelle des reinen Lösungsmittels ein Reagens, das die flüchtige Substanz in eine nicht flüchtige überführt, so sinkt der Dampfdruck über der Reagenslösung nahezu auf Null. Es wird sich also kein Gleichgewicht einstellen, sondern die flüchtige Substanz wird vollständig aus der Lösung in die Reagenslösung diffundieren und dort mit der Reagenslösung reagieren (Feldstein, 1956).

Die Mikrodiffusion wird meist in einer Conway-Schale durchgeführt, wie sie in Abbildung 4 dargestellt ist. Für den Schnellnachweis von Benzol im Blut wurden Conway-Schalen aus Glas verwendet.

Die Conway-Schalen bestehen aus einem inneren und einem äußeren Ring und können mit einem Schliffdeckel luftdicht verschlossen werden. Zwischen innerem und äußerem Ring besteht kein Luftabschluß.

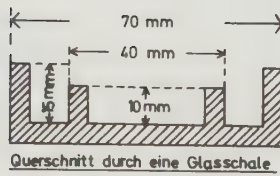
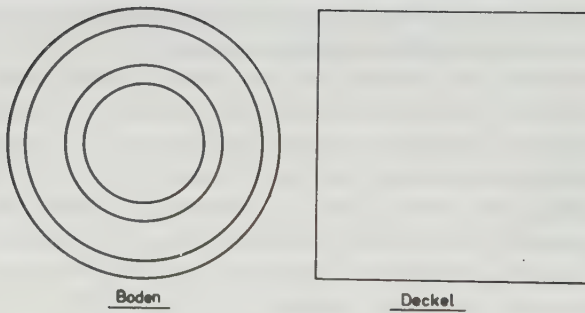


Abb. 4:

Aufsicht und Querschnitt durch eine Conway-Schale
(Feldstein, 1956)

Von großer Wichtigkeit für den Erfolg der Diffusionsmethode ist ein absolut luftdichter Abschluß zwischen Deckel und Schale. Zu diesem Zweck schmiert man zwischen den Schliff von Deckel und Schale etwas Vaseline, was bei Verfahren, die unter Raumtemperatur ablaufen, völlig ausreicht. Bei höheren Temperaturen verwendet man Silikonfett. Sowohl Vaseline als auch Silikonfett haben aber den Nachteil, daß sie sich beim Spülen sehr schlecht entfernen lassen. Es wird deshalb empfohlen, zwei andere Substanzen zu verwenden, und zwar Ukon und Carbonwax; mit Verwendung dieser beiden Substanzen sei das Reinigungsproblem der Schälchen gelöst (Feldstein, 1956). Die Diffusionszeit für verschiedene Verbindungen bei der Mikrodiffusionsmethode ist unterschiedlich und hängt nach Feldstein (1956) von verschiedenen Faktoren ab. Entscheidend ist

1. der Dampfdruck der flüchtigen Substanz
2. das Volumen der Lösung, in welcher die flüchtige Substanz gelöst ist
3. die Art des absorbierenden Mediums
4. die Temperatur, bei der die Mikrodiffusion stattfindet.

Man muß feststellen, daß der Effekt der einzelnen Faktoren für die Länge der Diffusionszeit nur für eine spezielle Conway-Schale gilt und daß eine Änderung der Ausmaße der Schale auch eine Änderung der Größe der Effekte dieser Faktoren für die Diffusionszeit zur Folge hat.

Weiterhin kann die Anwesenheit von Salzen in der zu analysierenden Flüssigkeit die Diffusion beschleunigen. Auch ein ständiges Rotieren der Schale während der Diffusion, so daß die Oberfläche der zu analysierenden Flüssigkeit ständig

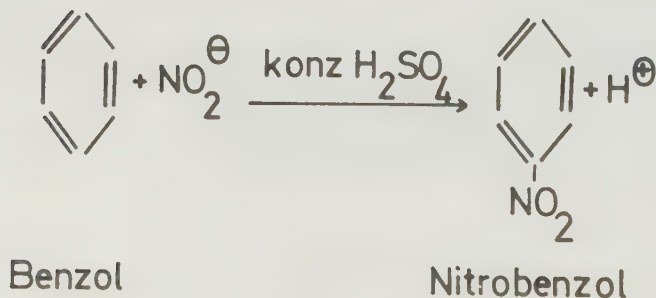
in Bewegung bleibt, führt zu einer Verkürzung der Diffusionszeit (Feldstein, 1956).

Die Diffusionszeit für die Mikrodiffusion von Benzol beträgt bei der von Feldstein (1956) beschriebenen Methode 2 Stunden.

9.2 Reaktionsmechanismus der Mikrodiffusionsmethode

Das chemische Prinzip des Nachweises von Benzol mit der Mikrodiffusionsmethode besteht darin, daß die aromatische Substanz in der Conway-Schale aus dem biologischen Material in Kaliumnitrathaltige, konzentrierte Schwefelsäure diffundiert. Das dort entstandene Nitrobenzol wird nach Reduktion und Diazotierung zu einem Farbstoff gekoppelt.

Der erste Schritt des Verfahrens ist also die Nitrierung des Benzols:



Die elektrophile Substitution ist die wichtigste Substitution bei Aromaten. Sie besteht in der Regel in der Verdrängung eines H-Atoms durch eine elektrophile Gruppe und wird erleichtert durch die hohe Ladungsdichte an den C-Atomen des Benzolringes.

Sodann wird die Farbreaktion durchgeführt. Das entstandene Nitrobenzol wird dabei zunächst zum Anilin reduziert:



Nitrobenzol

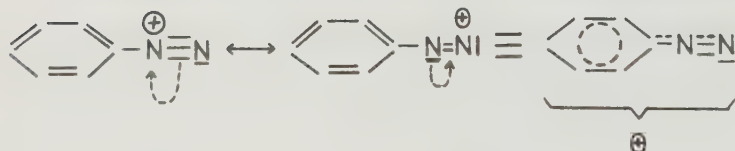
Anilin

Anschließend erfolgt die Diazotierungsreaktion. Anilin, ein primäres Amin, wird mit salpetriger Säure umgesetzt. Die bei der Umsetzung primärer aromatischer Amine mit salpetriger Säure (Diazotierung) entstehenden Diazoniumsalze sind infolge der Konjugation der Diazoniumgruppe mit dem aromatischen Kern verhältnismäßig stabil. Man führt die Diazotierung im allgemeinen in wässriger Lösung durch und erzeugt dabei die salpetrige Säure aus Natriumnitrit durch Zusatz von Mineralsäuren. Die erhaltenen Diazoniumsalze werden gewöhnlich nicht isoliert, sondern in Lösung weiterverarbeitet. Da die Basizität aromatischer Amine um Größenordnungen niedriger ist als die aliphatischer Amine, hat die Aktivierung der salpetrigen Säure durch Mineralsäuren bei der Diazotierungsreaktion besondere Bedeutung. Außerdem ist ein Säureüberschuß notwendig, um die Kupplung des entstandenen Diazoniumsalzes mit noch nicht umgesetztem freiem Amin

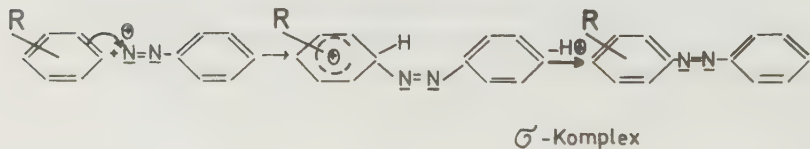
zu verhindern (Triazenbildung). Dennoch kann nur das im Hydrolysegleichgewicht vorliegende freie Amin als Additionspartner der salpetrigen Säure fungieren. Die Säurekonzentration richtet sich nach der Basizität der Amine. Bei Aminen vom Typ des Anilins werden pro Mol Amin und Natriumnitrit 2,5 bis 3 Mol Mineralsäure gebraucht.

Im nächsten Schritt des Nachweisverfahrens wird das überschüssige Natriumnitrit durch Amidosulfonsäure zerstört.

Dann erfolgt die Azokupplung. Diazoniumionen besitzen am endständigen Stickstoffatom elektrophile Eigenschaften (einen Elektronenunterschub), wie aus folgender Formulierung hervorgeht:



Sie sind daher in der Lage, Aromaten unter elektrophiler Substitution anzugreifen (Azokupplung), eine Reaktion, die den typischen elektrophilen Substitutionen an Aromaten zur Seite zu stellen ist. Die folgende Formel zeigt diese Reaktion:



Für die Azokupplung eignen sich entweder Amine oder Phenole. Es gibt für jede Kupplungsreaktion einen optimalen pH-Wert.

Die günstigste Bedingung bei der Verwendung von Phenolen ist ein schwach alkalisches Medium, da im stark alkalischen Milieu das Diazotat gebildet wird, das nicht kupplungsfähig ist.

Im stark sauren Bereich wird im allgemeinen keine Umsetzung mit Phenolen beobachtet, da die Konzentration an freiem Amin durch Salzbildung zu sehr vermindert wird.

Bei der Azokupplung entstehen die Azofarbstoffe, deren Extinktion im Photometer bestimmt werden kann.

Die Diffusion, die Reduktion, die Diazotierung und die Kupplung sind also die 4 Reaktionsschritte, die für die zu testende Methode eines Nachweises von Benzol im Blut von Bedeutung sind.

10. Prüfung der Mikrodiffusionsmethode und Kritik mit Entwicklung einer eigenen Variante

10.1 Erste Arbeitsvorschrift für die Mikrodiffusionsmethode

Man benötigt folgende Reagenzien:

Konz. Schwefelsäure p.a., Kaliumnitrat p.a., Zink granuliert p.a., 4,5 %ige wässrige Natriumnitritlösung, Amidosulfonsäure, alkalische Alphanophtollösung 0,1 g in 10 %iger Natronlauge.

In den inneren Ring einer Conway-Schale werden 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure und 150 mg Kaliumnitrat gegeben. Der äußere Ring enthält 1 - 3 ml des Probenmaterials. Nach zwei Stunden werden 0,5 ml der Schwefelsäure entnommen und mit 3 ml Wasser verdünnt, mit einem Zinkgranulum reduziert und filtriert. Das Filtrat wird unter fließendem Wasser gekühlt und mit 0,5 ml 4,5 % Kaliumnitritlösung versetzt.

Der Überschuß an Natriumnitrit wird mit Amidosulfonsäure zerstört und 7 ml Alphanaphtollösung werden zugegeben. Die Entstehung eines roten bis rotbraunen Farbstoffes zeigt die Anwesenheit von Benzol an.

10.2 Prüfung und Kritik der Originalarbeitsvorschrift

Bei den eigenen Untersuchungen wurde zunächst genau nach der Originalvorschrift verfahren. Im Laufe der Untersuchungen wurde jedoch das Verfahren etwas modifiziert, da sich gewisse Unzulänglichkeiten der Originalvorschrift erwiesen.

Als Probenmaterial wurde bei den Versuchen heparinisiertes Vollblut verwendet, dem Benzol zugesetzt war, wobei auf sorgfältige Mischung geachtet wurde. Das Vollblut wurde dabei jeden Morgen aus der Vene verschiedener Personen frisch entnommen.

Das Probenmaterial, also Benzol mit Blut vermischt, wurde in den äußeren Ring der Conway-Schale gegeben und zwar 1 - 3 ml. In den inneren Ring der Schale wurden 1,5 ml konzentrierte Schwefelsäure pipettiert, in der 150 mg Kaliumnitrat gelöst waren. Nach 2 Stunden Diffusionszeit bei luftdicht abgeschlossener Schale wurden 0,5 ml der Schwefelsäure entnommen und in ein Reagenzglas übergeführt. Das Reagenzglas wurde sodann im Wasser/Eis-Bad abgekühlt.

Die Reduktion, die der Diffusion folgt, wurde weiter im Wasser/Eis-Bad durchgeführt. Hierzu wurde der Inhalt des Reagenzglases mit 3 ml Wasser verdünnt und mit Zinkgranula unter ständiger Kühlung solange reduziert, bis keine wesentliche Gasentwicklung mehr vorhanden war.

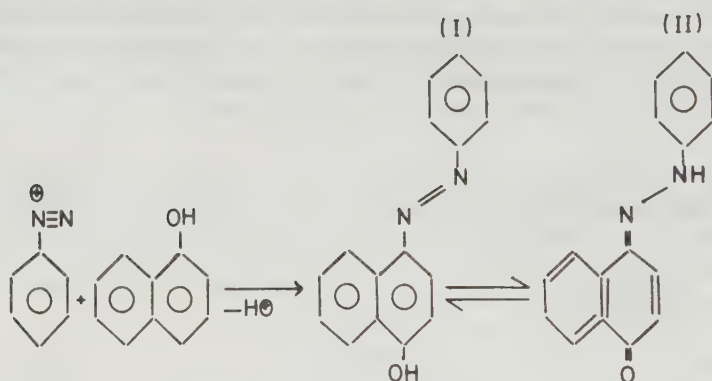
In der Originalvorschrift waren als Reduktionsmittel Zinkgranula angegeben. Nachdem Versuche mit Zinkgranula durchgeführt wurden, wobei der Reduktionsvorgang bis zu 15 - 20 Minuten in Anspruch nahm, d.h. bis keine wesentliche Gasentwicklung mehr auftrat, wurde eine Änderung der Originalvorschrift vorgenommen, um das Verfahren abzukürzen, da es ja als ein Schnellverfahren gedacht war.

Statt Zinkgranula wurde Zinkstaub verwendet und zwar ungefähr eine Spatelspitze voll. Aufgrund der relativ größeren Oberfläche von Zinkstaub ließ sich die Reduktionszeit bis zur Beendigung der Gasentwicklung auf ungefähr eine Minute verkürzen.

Nach erfolgter Reduktion wurde nun von den Feststoffen abfiltriert, mit 1 ml Wasser nachgewaschen und das Filtrat auf 0 °C gekühlt. Die Diazotierung muß bei einer Temperatur unter 5 °C stattfinden. Es wurde durch Zugabe von 0,5 ml 4,5 %iger Natriumnitritlösung diazotiert. Das überschüssige Natriumnitrit wurde durch etwas Amidosulfonsäure zerstört, wobei solange Amidosulfonsäure zugegeben wurde, bis keine Stickstoffentwicklung mehr stattfand. Jetzt erfolgte die Azokupplung.

Die Versuche wurden zuerst mit α -Naphtollösung durchgeführt, wie es in der Originalvorschrift angegeben war. Im Laufe der Arbeit stellte sich jedoch die Unbrauchbarkeit dieser Substanz für unsere Zwecke heraus. Auf den Grund wird im folgenden Absatz näher eingegangen.

Bei der Kupplung mit α -Naphtollösung entsteht ein roter bis rotbrauner Azofarbstoff. Es entstehen Azobenzolderivate (I), die in einem tautomeren Gleichgewicht zu ihren Chinonhydrazonen (II) stehen. Die Lage des Gleichgewichts ist stark lösungsmittelabhängig; das gilt auch für wässrige Lösungen (Kuhn und Bär, 1935).



Bei den verschiedenen Experimenten mit α -Naphtollösung waren keine reproduzierbaren Extinktionswerte zu erhalten, d.h. innerhalb der verschiedenen Ansätze ergab sich kein einheitliches Extinktionsmaximum (siehe Abb. 5). Zu vermuten ist eine starke Abhängigkeit der Gleichgewichte (I) $\rightleftharpoons$ (II) vom Lösungsmittel und dessen Ionenstärke. Auch die unter Umständen nicht sehr hohe Geschwindigkeit der Gleichgewichtseinstellung könnte hierbei eine Rolle spielen.

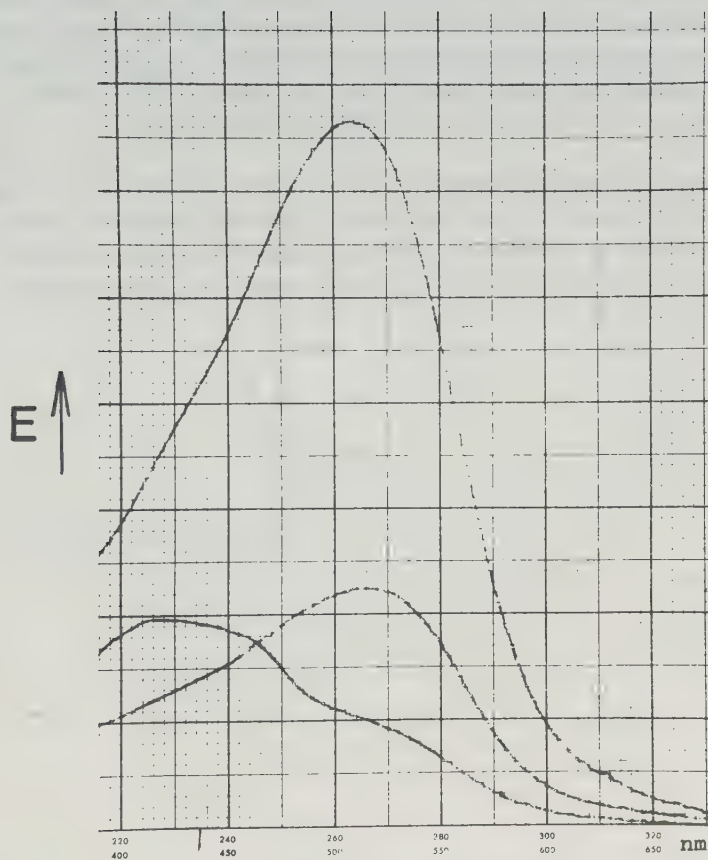
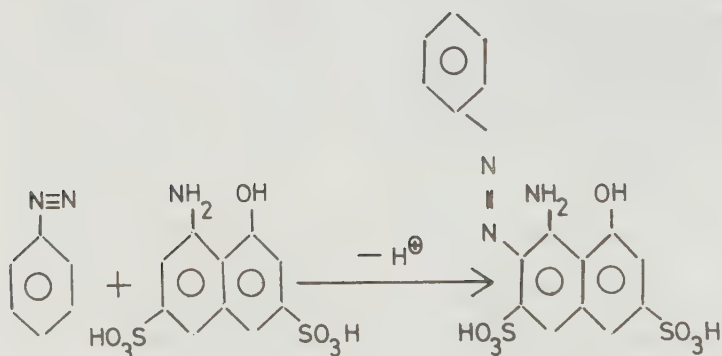


Abb. 5:

VIS-Spektren, aufgenommen im Bereich 700 - 400 nm, bei der Verwendung von α -Naphthol als Kupplungskomponente (Benzolkonzentration im Blut: 12, 20 und 50 $\mu\text{l}/100\text{ ml}$)

Bei diesem Schritt wurde im Verlauf der Versuche wieder von der Originalvorschrift abgewichen. Es war nicht sinnvoll, die Arbeitsweise so umzustellen, daß eine gleiche Ionenstärke während der Nachweisreaktion aufrechterhalten wird. Vielmehr wurden Kupplungskomponenten verwendet, bei denen sich nach Azokupplung keine derartigen Gleichgewichte einstellen können, bzw. diese extrem auf einer Seite liegen.

Wegen seiner Wasserlöslichkeit, der kräftigen Farbe des Kupplungsproduktes (rot bis rotviolett) und der relativen Stabilität des Reagens wurde 8-Amino-1-naphtol-3,6-disulfonsäure (H-Säure) verwendet. Der Kupplungsvorgang ist im folgenden wiedergegeben:



Die Extinktionskoeffizienten des Reaktionsproduktes im sichtbaren Bereich sind mit denen der α -Naphtolkupplung vergleichbar (siehe Abb. 6). Die mit H-Säure als Kupplungskomponente erzielten Ergebnisse sind reproduzierbar.

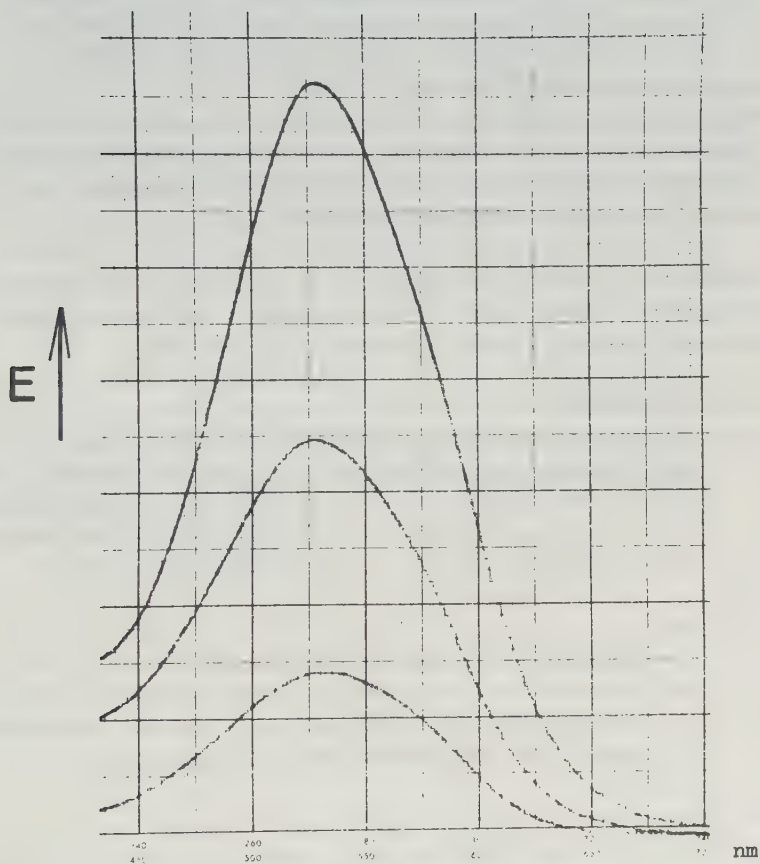


Abb. 6:

VIS-Spektren, aufgenommen im Bereich 700 - 400 nm, bei der Verwendung von H-Säure als Kupplungskomponente (Benzolkonzentration im Blut: 10, 20 und 50 µl/100 ml)

10.3 Eigene Arbeitsvorschrift für die Mikrodiffusions- methode

Aufgrund der gewonnenen Erfahrungen bei den verschiedenen Versuchen wurde eine neue Arbeitsvorschrift entwickelt:

Als Reagenzien benötigt man:

Konz. Schwefelsäure p.a., Kaliumnitrat p.a., Zinkstaub p.a. (Merck), 4,5 %ige Natriumnitritlösung p.a., Amdosulfonsäure p.a., H-Säure-8-Amino-1-naphtol-3,6-disulfonsäure (umkrist.), 220 mg in 100 ml wässriger Lösung.

Am Material benötigt man weiterhin eine Conway-Schale, Reagenzgläser, Glastrichter, Filterpapier, Pipetten sowie zu einem genauen quantitativen Nachweis ein Photometer.

a) Diffusion:

In den inneren Ring der Conway-Schale werden 1,5 ml konz. Schwefelsäure gegeben und darin 150 mg Kaliumnitrat aufgelöst. Der äußere Ring enthält 3 ml des Probenmaterials. Nach 2 Stunden Diffusionszeit werden 0,5 ml der Schwefelsäure entnommen und in ein Reagenzglas übergeführt.

b) Reduktion:

Das Reagenzglas wird im Wasser/Eis-Bad gekühlt, der Inhalt mit 3 ml Wasser verdünnt und mit etwas Zinkstaub unter Kühlung reduziert. Man filtriert von den Feststoffen ab, wäscht mit 1 ml Wasser nach und kühlt das Filtrat auf 0 °C.

c) Diazotierung, Kupplung:

Unter ständiger Kühlung im Wasser/Eis-Bad verfährt man wie folgt:

- Diazotieren durch Zugabe von 0,5 ml 4,5 %iger Natriumnitrit-Lösung
- Zerstören des überschüssigen Natriumnitrits durch etwas Amidosulfonsäure (Endpunkt der N-Entwicklung kontrollieren)
- kuppeln durch Zugabe von 7 ml H-Säure-Lösung, während 10 Minuten gelegentlich schütteln.

Jetzt wird die Kühlung entfernt und die Reaktionslösung während weiterer 10 Minuten gelegentlichen Schüttelns auf Raumtemperatur gebracht. Bei auftretender Trübung muß zentrifugiert werden. Je nach der Höhe der Benzolkonzentration im Blut muß die Reaktionslösung eventuell verdünnt werden, um eine photometrische Messung noch zu ermöglichen.

d) Quantitative Auswertung:

Zuerst wird ein Spektrum im Bereich von 700 - 400 nm aufgenommen. Die Extinktion wird im Bereich von 520 - 535 nm gemessen. Als Referenz zur Probe verwendet man Wasser. (E nimmt zu!)

10.4 Aufstellung einer Eichkurve

In den Vorversuchen war bereits festgestellt worden, daß eine Diffusion überhaupt stattfindet. Nun stellte sich das Problem der Herstellung einer Eichkurve für das Verfahren.

Die ersten Versuche zur Herstellung einer Eichkurve fanden mit isotonischer Kochsalzlösung anstelle von Blut als Lösungsmittel statt. Zu diesem Zweck wurden 5 verschiedene Lösungen ver-

schiedener Konzentrationen hergestellt und zwar 5, 10, 20, 50 und 100 μ l Benzol/100 ml isotonischer Kochsalzlösung. Die Lösungen wurden in 500 ml Schliff-Flaschen aufbewahrt. Es stellte sich jedoch nach einiger Zeit heraus, daß sich bei dieser Aufbewahrungsmethode für die Proben keine reproduzierbaren Konzentrationswerte erzielen ließen. Dies kann sowohl an der mangelhaften Löslichkeit von Benzol in isotonischer Kochsalzlösung gelegen haben als auch an der Tatsache, daß sich durch das häufige Öffnen der Flaschen die Lösungsgleichgewichte verschoben, da bei jedem Öffnen der Flaschen etwas Benzoldampf entweichen konnte. Deshalb wurde auf weitere Versuche mit isotonischer Kochsalzlösung als Lösungsmittel verzichtet und statt dessen als Lösungsmittel sofort Blut verwendet.

Zur Blutentnahme wurden 10 ml Heparinspritzen (Li.Heparinat, Sarstedt) verwendet. Diese Spritzen hatten den Vorteil, daß auf der einen Seite die Spritze durch einen Schraubverschluß leicht zu öffnen war und man das Benzol direkt in das Blut einspritzen konnte.

Zur Bestimmung der Eichgeraden wurden 5 Lösungen verschiedener Konzentration von Benzol im Blut hergestellt. Beim Einspritzen des Benzols in das Blut mit Hilfe von Mikroliterspritzen wurden die Heparinröhrchen nur ganz kurz geöffnet und sofort nach dem Einspritzen wieder verschlossen. Sodann wurden die Proben gut geschüttelt, um ein möglichst homogenes Blut/Benzol-Gemisch zu erhalten. Anschließend wurden die Heparinspritzen wieder geöffnet und jeweils 3 ml aus diesen Proben in den äußeren Ring einer Conway-Schale pipettiert und die Conway-Schale sofort verschlossen. Mit den Proben wurde dann wie in der Arbeitsvorschrift beschrieben verfahren. Bei der Messung der Extinktion wurden die in der Arbeitsvorschrift geforderten Zeiten genau eingehalten, da eine Zunahme der Extinktion vom Zeitpunkt der Herausnahme der Proben aus dem Eisbad bis

zu 30 Minuten nach der Herausnahme aus dem Eisbad festzustellen war. Da das Verfahren als ein Schnellverfahren gedacht war, wurde mit der Messung nicht bis zum Stillstand der Extinktionszunahme gewartet.

Die Messung der Proben erfolgte unverdünnt bei einer Wellenlänge von 523 nm gegen Wasser.

Bei der Messung mit dem Photometer fanden sich die Ergebnisse, wie sie in Tabelle 1 eingetragen sind!

5	10	20	50	100	Benzolkonz. im Blut (μ l/100 ml)
0,004	0,042	0,27	0,43	2,75	Extinktion 1. Vers.
0,002	0,025	0,18	0,58	2,10	Extinktion 2. Vers.
0,006	0,033	0,30	0,89	2,26	Extinktion 3. Vers.
0,012	0,050	0,25	0,56	2,39	Extinktion 4. Vers.
0,020	0,030	0,63	0,73	2,31	Extinktion 5. Vers.
0,006	0,036	0,326	0,638	2,362	Mittelwert
0,003	0,009	0,17	0,176	0,241	$\pm$ Standardabweichung

Tabelle 1: Extinktion in Abhängigkeit von der Blutbenzolkonzentration bei Mikrodifffusion.

Trägt man die Mittelwerte in einer Kurve auf, so erhält man die Kurve, wie sie in Abbildung 7 dargestellt ist. Die Kurve weist keinen ideal linearen Verlauf auf.

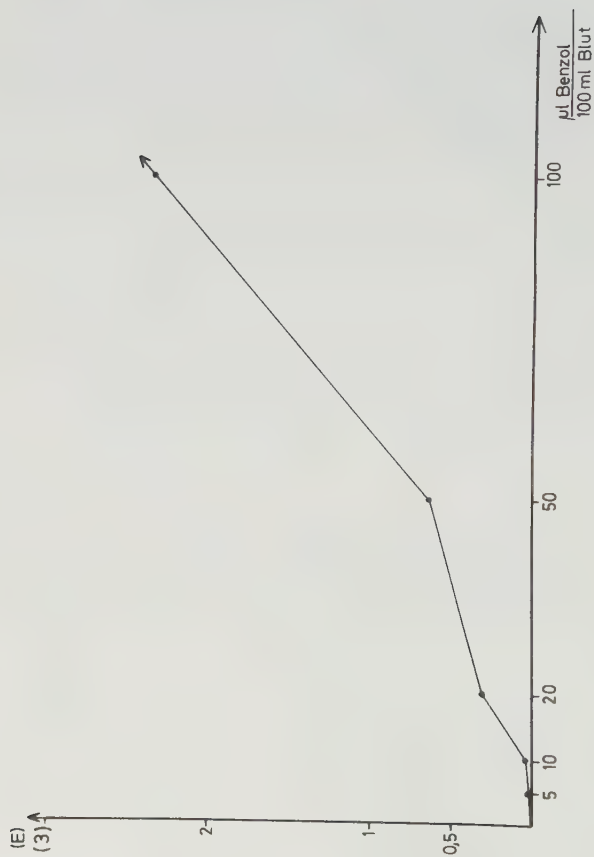


Abb. 7:
Eichkurve für Benzol im Blut bei der Mikrodiffusionsmethode

10.5 Bestimmung der Wiederfindungsrate

Die Frage war nun, wo der Grund für den keineswegs idealen Verlauf der Kurve zu suchen war. Als Ursache kamen 2 Möglichkeiten in Betracht:

1. eine Störung der Diffusion
2. eine Störung der Kupplung mit dem Farbstoff.

Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten differenzieren zu können, mußte deshalb zunächst die Wiederfindungsrate des Verfahrens bestimmt werden. Unter Wiederfindungsrate des Verfahrens ist der Prozentsatz an Benzol zu verstehen, der nach der Diffusion in der Probe nachgewiesen werden kann im Verhältnis zu der Menge Benzol, die bei direkter Zugabe von Benzol zu Kaliumnitrat und konzentrierter Schwefelsäure ohne Diffusion nachgewiesen werden kann.

Es wurde folgendermaßen verfahren:

Einem Ansatz aus 150 mg Kaliumnitrat und 1,5 ml konz. Schwefelsäure wurden mit Hilfe einer Mikroliterspritze verschiedene Mengen an Benzol direkt zugesetzt. Nach gutem Mischen wurden 0,5 ml aus dem Ansatz entnommen und mit 3 ml destilliertem Wasser verdünnt. Anschließend wurde weiter nach der Arbeitsvorschrift verfahren.

Dem Ansatz aus 1,5 ml konzentrierter Schwefelsäure und 150 mg Kaliumnitrat wurden jeweils 0,5; 1; 2; 5 und 10 μ l Benzol direkt zugesetzt. In 0,5 ml mußten sich also $\frac{0,5}{3}$; $\frac{1}{3}$; $\frac{2}{3}$; $\frac{5}{3}$ und $\frac{10}{3}$ μ l Benzol befinden.

Für diese Benzolmengen in 0,5 ml entnommener Schwefelsäurelösung fanden sich nach erfolgter Kupplung mit dem Farbstoff folgende Extinktionswerte:

(Die in eckigen Klammern stehenden Werte sind nach Verdünnung vor der Messung mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert, da das Photometer nur Extinktionswerte bis 2,8 maß.)

μl Benzol in 0,5 ml entn. H_2SO_4 -Lösung	E_1	E_2	E_3	Mittel- wert	$\pm$ Standard- abweichung
0,16	0,73	0,84	0,69	0,75	0,08
0,33	1,69	1,77	1,41	1,62	0,19
0,66	[3,25]	[2,91]	[3,49]	[3,21]	0,29
1,66	[8,00]	[8,72]	[8,40]	[8,36]	0,36
3,33	[16,2]	[18,1]	[15,5]	[16,6]	1,42

Tabelle 2: Gemessene Extinktionswerte in Abhängigkeit von der Menge Benzol in 0,5 ml entnommener Schwefelsäurelösung bei direkter Zugabe zum Ansatz (ohne Diffusion).

Trägt man die gemessenen Extinktionswerte gegen die Menge Benzol in 0,5 ml entnommener Schwefelsäurelösung auf, so erhält man eine Kurve mit linearem Verlauf (siehe Abb. 8).

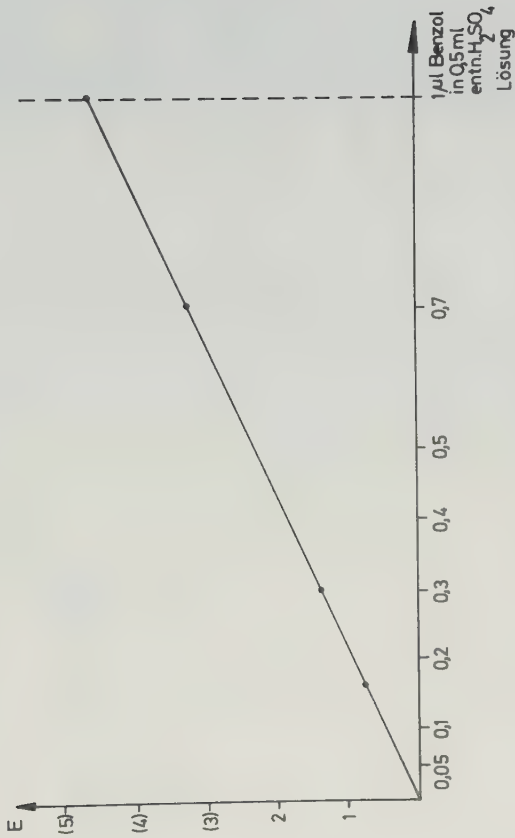


Abb. 8:
Extinktionswerte, aufgetragen gegen die Benzolmenge in
0,5 ml entnommener H_2SO_4 -Lösung (Benzol wurde dem Ansatz
direkt zugesetzt, also keine Diffusion)

Für die Blutbenzolkonzentrationen von 5, 10, 20, 50 und 100 μl Benzol/100 ml Blut hätten sich bei vollständiger Diffusion in 0,5 ml entnommener Schwefelsäure 0,05; 0,1; 0,2; 0,5 und 1 μl Benzol wiederfinden müssen (= 100 %). Für die Benzolmenge nach der Diffusion in 0,5 ml entnommener Schwefelsäurelösung fanden sich folgende Extinktionswerte, wie sie in Tabelle 3 auf Seite 38a wiedergegeben sind.

In Abbildung 9 wird die sehr schlechte Wiederfindungsrate des Mikrodiffusionsverfahrens vor allem in den für uns interessanten niederen Konzentrationsbereichen deutlich. Sie liegt bei den für unsere Versuchszwecke gewählten Blutbenzolkonzentrationen im Bereich von 3 % (Blutbenzolkonzentration 5 μl /100 ml) bis ca. 47 % (Blutbenzolkonzentration 100 μl /100 ml).

erw. Benzol- menge in 0,5 ml H ₂ SO ₄ -Lösung bei 100 %-Wie- derfindung (μl)	wiedergef. Benzolmenge in 0,5 ml H ₂ SO ₄ -Lösung (μl)	wiedergef. Benzolmenge in %	E ₁	E ₂	E ₃	E ₄	E ₅	Mittel- wert	± ΔS
0,05	0,001	3	0,004	0,002	0,006	0,012	0,020	0,060	0,008
0,10	0,01	9,4	0,042	0,025	0,033	0,050	0,030	0,036	0,009
0,20	0,06	33,8	0,270	0,180	0,300	0,250	0,630	0,326	0,170
0,50	0,12	25,4	0,430	0,580	0,890	0,560	0,730	0,638	0,176
1,00	0,47	47,4	2,750	2,100	2,260	2,390	2,310	2,362	0,241

Tabelle 3: Gemessene Extinktion nach Diffusion in Abhängigkeit von der erwarteten Benzolmenge in 0,5 ml entnommener Schwefelsäurelösung bei 100 % Wiederfindung

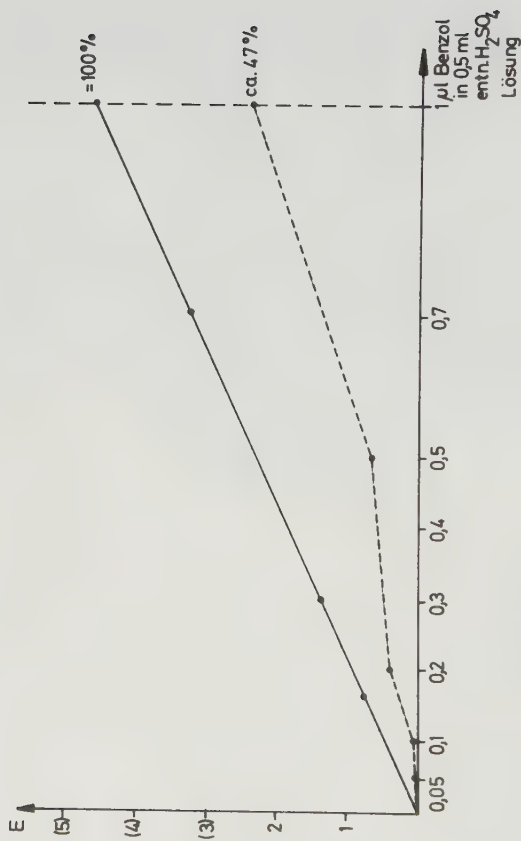


Abb. 9:

— Extinktionswerte für Benzol bei direkter Zugabe zum Ansatz

- - - - - Extinktionswerte für Benzol bei Mikrodiffusion

Der flache und nicht lineare Verlauf der Eichkurve ist also nicht auf eine schlecht reproduzierbare Kupplung mit dem Farbstoff zurückzuführen, sondern vielmehr auf eine nicht einwandfreie quantitativ reproduzierbare Diffusion und außerordentlich schlechte Wiederfindung in niederen Blutbenzolkonzentrationsbereichen.

10.6 Spezifitätsprüfung

Um die Spezifität des Verfahrens zu testen, wurden verschiedene Substanzen hinsichtlich ihrer Störgröße für das Verfahren untersucht. Für diese Versuche wurden hauptsächlich Substanzen verwendet, die in ihrer chemischen Struktur dem Benzol ähneln und so das Nachweisverfahren hätten stören können.

Folgende Substanzen wurden untersucht:

Toluol
Xylol
Pyridin
Phenol
Anilin

Zuerst wurden die Substanzen daraufhin untersucht, inwieweit sie überhaupt mit dem Farbstoff kuppeln. Hierzu wurden einem Ansatz aus konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumnitrat die verschiedenen zu prüfenden Substanzen direkt zugesetzt. Anschließend wurde mit den Proben wie schon beschrieben verfahren.

Es stellte sich heraus, daß sowohl Toluol als auch Xylol mit dem Farbstoff kuppeln.

Bei den Substanzen Pyridin, Phenol, Anilin und Aceton fand keine Kupplungsreaktion und keine Farbentwicklung statt. Diese Substanzen schieden also als Störfaktoren für das Verfahren aus.

Mit Toluol und Xylol wurden nun die gleichen Diffusionsversuche wie mit Benzol unternommen. Die dabei verwendeten Konzentrationen betrugen 1 ml Substanz/100 ml Blut.

Dabei fand sich bei Toluol bei den abschließenden Extinktionsmessungen keine meßbare Extinktion mehr. Es ist also davon auszugehen, daß Toluol noch wesentlich weniger als Benzol diffundiert.

Bei den Versuchen mit Toluol konnte überraschenderweise eine Extinktion gemessen werden und zwar bei 3 Versuchen:

Extinktion:	1. Versuch	2. Versuch	3. Versuch
	0,13	0,24	0,11

Es zeigte sich, daß Xylol ebenso wie Benzol diffundiert, wenn auch in einem viel geringeren Maß als Benzol: Die bei den Versuchen mit Xylol gemessenen Extinktionswerte waren um den Faktor 100 kleiner als die bei Benzol gemessenen Werte. Dennoch läßt sich sagen, daß das Verfahren zum Nachweis von Benzol im Blut mit Hilfe der Mikrodiffusionsmethode nicht streng spezifisch für Benzol ist, sondern durch die Anwesenheit von Xylol gestört werden könnte.

10.7 Nachweisgrenze des Verfahrens

Zur Bestimmung der Nachweisgrenze des Verfahrens wurden mehrere Diffusionsvorgänge bei jeweils fallenden Benzolkonzentrationen im Blut durchgeführt.

Die gerade noch meßbare Benzolkonzentration im Blut, das heißt die, deren Extinktion im Photometer gerade noch ablesbar war, lag bei 5 µl/100 ml Blut.

11. D i s k u s s i o n

Die geprüfte Mikrodiffusionsmethode war als ein Schnellverfahren zum Nachweis von Benzol im Blut gedacht. Die Nachweisgrenze des Verfahrens liegt durchaus im Bereich der Nachweisgrenze früherer gaschromatographischer Verfahren (Szadkowski et al., 1971). Die Nachweisgrenze neuerer gaschromatographischer Methoden liegt allerdings um den Faktor 1000 niedriger als die der Mikrodiffusionsmethode (Henschler, 1978). Für arbeitsmedizinisch-toxikologische Überwachungsuntersuchungen lösemittel-exponierter Werktätiger ist die Mikrodiffusionsmethode sicherlich nicht geeignet, da die bei chronisch Exponierten gefundenen Benzolkonzentrationswerte im Blut weit niedriger lagen als die Nachweisgrenze der Mikrodiffusionsmethode (Hagemann und Angerer, 1977). Die Werte, die bei akuten Benzolintoxikationen im Blut gefunden wurden, liegen in etwa im Bereich der Nachweisgrenze des Mikrodiffusionsverfahrens. Bei solchen Fällen einer akuten Intoxikation könnte das Verfahren vielleicht eingesetzt werden, um festzustellen, ob Aufnahme von Benzol vorlag. Die Methode wäre sicherlich einfacher und billiger, als etwa gaschromatographische Verfahren. Die Blutentnahme für eine Untersuchung

müßte direkt am Ort der Exposition erfolgen, da das Benzol relativ schnell über die Lungen wieder abgeatmet wird und sich bis zu einem Besuch beim Arzt die Benzolkonzentration stark verändert hätte bzw. nicht mehr meßbar wäre. Der kritische Punkt bei einem solchen Vorgehen wäre sicherlich das Einspritzen der Probe in die Conway-Schalen, da sich schon bei diesem Arbeitsvorgang die Benzolkonzentration in den Proben meßbar verändern könnte. Dieser Arbeitsvorgang mag auch zu der mangelhaften Eichkurve des Verfahrens mit beigetragen haben.

Der Hauptgrund für die ungünstige Eichkurve des Verfahrens lag aber sicher in der nicht einwandfreien Reproduzierbarkeit des Diffusionsvorgangs, da sich bei direktem Zusatz von Benzol zu dem Ansatz aus konzentrierter Schwefelsäure und Kaliumnitrat eine ideal linear verlaufende Kurve fand. Es zeigte sich ferner, daß die Wiederfindungsrate des Verfahrens mit steigenden Benzolkonzentrationen im Blut deutlich zunimmt. Je höher die Benzolkonzentration im Blut ist, desto präziser arbeitet das Nachweisverfahren.

Wegen der schlechten Wiederfindungsrate in niederen Konzentrationsbereichen ($5 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$ - $50 \mu\text{l}/100 \text{ ml}$ Blut) ist das Verfahren in diesen Bereichen sicherlich nicht für quantitative Messungen einsetzbar. Diese Konzentrationsbereiche sind jedoch schon identisch mit den bei tödlichen Benzolintoxikationen im Blut gefundenen Werte. Das Mikrodiffusionsverfahren scheint deshalb für eine Anwendung in der Praxis nicht geeignet zu sein.

13. Literaturverzeichnis

- 1) Bakke, O.M.; Scheline, R.R.: Hydroxylation of Aromatic Hydrocarbons in the Rat. Toxic. Appl. Pharmac. 16, 691 (1970)
- 2) Barrelet, J.: Some Fatal Cases of Intoxication Caused by Benzene. Rev. med. Suisse rom. 12, 845 (1961)
- 3) Drozd, J.; Bockowski, E.J.: Acute Benzene Poisoning. J. occup. Med. 9, 9 (1967)
- 4) Dubois, Jp.: 3 Fatal Cases of Benzene Intoxikation. Rev.med. Suisse rom. 12, 851 (1961)
- 5) Dutkiewicz, T.: Skin Absorption of Toluene, Styren and Xylen by Man. Brit. J. Ind. Med. 25, 243 (1968)
- 6) Feldstein, M.: Microdiffusion as Applied to Toxicology. J. For. Sci, 2, 39 (1958)
- 7) Forni, A.; Moreo, L.: Chromosome Studies on Workers Exposed to Atmospherie Benzene. Eur. J. Cancer 5,459 (1969)
- 8) Hagemann, J.; Angerer, J.: Arbeitsmedizinische Risiko-
(Herausgeber: Szadkowski, D.) beurteilung (Eignung und Tauglichkeit). Verhandlungen der Deutschen Gesellschaft e.V. für Arbeitsmedizin, 17. Jahrestagung in Kiel vom 5. - 7. Mai 1977
- 9) Hartwich, G.; Schwannitz, G.; Becker, J.: Chromosome Anomalies in Case of Benzene Leukaemia. Dtsch. med. Wschr. 14, 449 (1969)

- 10) Henschler, D.:
(Herausgeber)
Gesundheitsschädliche Arbeitsstoffe.
Toxikologische-arbeitsmedizinische Begründung von MAK-Werten.
Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1979)
- 11) Henschler, D.:
(Herausgeber)
Analysen im biologischen Material.
Analytische Methoden zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe, Band 2, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1974)
- 12) Hernberg, S.; Savilahti, K.;
Ahlman, K. und S.ASP:
Prognostic Aspects of Benzene Poisoning.
Brit. J. Ind. Med. 23,
204 (1966)
- 13) Kahac, B.; Zdenek, J.;
Vejdelek:
Handbuch der photometrischen Analyse organischer Verbindungen
Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1977)
- 14) Kuhn, R.; Bär, F.:
Über die Konstitution der Oxy-azoverbindungen.
Liebigs Ann. Chem. 516,
143 (1935)
- 15) Laham, S.:
Metabolism of Industrial Solvents.
The Biotransformation of Benzene and Benzene Substitutes.
Occup. Hlth. Rev. 21,
24 (1970)
- 16) Lob, M.:
Danger from Benzene in Laboratories.
Med. Lav. 68, 140 (1977)
- 17) Organikum:
Organisch-chemisches Grundpraktikum
VEB
Deutscher Verlag der Wissenschaften
Berlin 1977

- 18) Porteous, J.W.;
Williams, R.T.; zit. in: Benzene in the Work Environment.
Deutsche Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1974)
- 19) Sato, A.; Nakajima, T.;
Fujiwara, Y.; Murayama, N.: Kinetic Studies on Sex Difference in Susceptibility to Chronic Benzene Intoxikation-with Special Reference to Fat Content.
Brit. J. Ind. Med. 32, 321 (1975)
- 20) Sato, A.; Nakajima, T.;
Fujiwara, Y.; Hirose, K.: Pharmacokinetics of Benzene and Toluene.
Int. Arch. Arbeitsmed. 32, 169 (1974)
- 21) Sherwood, R.J., zit. in: Benzene in the Work Environment.
Deutsche Forschungsgemeinschaft, Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1974)
- 22) Schuckmann, F.: Möglichkeiten der Diagnostik und Prophylaxe des chronischen Benzolschadens.
Zbl. Arbeitsmed. 10, 294 (1972)
- 23) Steinborn, J.: Schäden des hämatopoetischen Systems durch Lösungsmittel und ihre labordiagnostische Erfassung.
Zbl. Arbeitsmed. 18, 312 (1965)
- 24) Szadkowski, D.; Schröter, U.;
Essing, H.-G.; Schaller, K.-H.;
Lehnert, G.: Ein gaschromatographisches Nachweisverfahren für Benzol und Toluol in kleinsten Blutproben.
Int. Arch. Arbeitsmed. 27, 520 (1970)

- 25) Tauber, J.B.: Instant Benzol Death.
J. occup. Med. 12,
520 (1970)
- 26) Though, M.; Smith, P.G.;
Court Brown, W.M.;
Harden, D.G.: Chromosome Studies on Workers
Exposed to Atmospheric Ben-
zene.
Eur. J. Cancer 6, 49 (1969)
- 27) Truhaut, R.: Sur la fixation d'une limite
tolerable pour le benzene dans
les ambiances de travail.
Arch. Mal. Prof. 29, 5 (1968)
- 28) Winek, C.L.; Wellon, D.C.;
Hecht, C.H.: Fatal Benzene Exposure by
Glue-Sniffing.
The Lancet 25, 683 (1967)
- 29) Winek, C.L.; Wellon, D.C.: Benzene and Toluene Fatali-
ties.
J. Occup. Med. 13, 259 (1971)
- 30) Zeyer, H.G.: Vergiftung durch Benzol und
seine Homologen, in:
Bader, E.W. "Handbuch der ge-
samten Arbeitsmedizin",
Band 2, 1. Teilband, 422,
Urban und Schwarzenberg, Ber-
lin, München und Wien (1961)

Ich danke Herrn Prof. Dr. H.-B. Wuermeling für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes an seinem Institut und für die Übernahme des Korreferates.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Frau Prof. Dr. Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt für die Überlassung des Themas und die freundliche und aufgeschlossene Beratung in vielen wichtigen Fragen. Mein Dank gilt auch allen Mitarbeitern in den toxikologischen Labors, die mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dipl.-Chem. Enders für die überaus freundliche Unterstützung bei der Lösung chemischer Probleme.

L E B E N S L A U F

Am 4.2.1952 wurde ich in Schwabach als 3. Kind des Dipl.-Ing. Richard Lipps und dessen Ehefrau Franziska, geb. Dimpfl, geboren.

Von 1958 - 1962 besuchte ich die Volksschule in Schwabach. Anschließend wechselte ich an das Adam-Kraft-Gymnasium in Schwabach, das ich bis zum Abitur im Jahre 1971 besuchte.

1972 begann ich mit einem Doppelstudium der Human- und Zahnmedizin an der Universität Marburg. 1974 setzte ich mein Studium der Humanmedizin an der Universität Erlangen-Nürnberg fort. 1976 legte ich das Physikum in Erlangen ab, 1977 bestand ich die 1. ärztliche Prüfung, 1979 die 2. ärztliche Prüfung. 1980 ging ich mit dem medizinischen Staatsexamen von der Universität Erlangen-Nürnberg ab.

